

⑫ 公表特許公報(A)

昭64-500353

⑬ 公表 昭和64年(1989)2月9日

⑭ Int. Cl.⁴
C 07 H 19/173
19/20
21/04

識別記号

庁内整理番号

7417-4C
7417-4C
7417-4C※

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全 8 頁)

⑮ 発明の名称 2'-デオキシアデノシン誘導体を含む核酸検出用プローブ

⑯ 特 願 昭62-504442

⑰ 出 願 昭62(1987)7月22日

⑱ 翻訳文提出日 昭63(1988)3月22日

⑲ 国際出願 PCT/FR87/00291

⑳ 国際公開番号 WO88/00593

㉑ 国際公開日 昭63(1988)1月28日

優先権主張 ㉒ 1986年7月22日 ㉓ フランス(FR) ㉔ 8610630

㉕ 発 明 者 ヤン・ダン, タム

フランス国、78290・クロワシ・スユール・セヌ、リュ・ポール・デルレード・32

㉖ 発 明 者 サルファティ, シモン

フランス国、75011・パリ、リュ・ドウ・ラ・ロケツト・142

㉗ 発 明 者 イゴラン, ジャン

フランス国、78320・ル・メニル・サン・ドニ、リュ・クロワ・マテュリヌ・4

㉘ 出 願 人 アンステイテユ・バストゥール

フランス国、75724・パリ・セデクス・15、リュ・ドユ・ドクトール・ルー・25-28

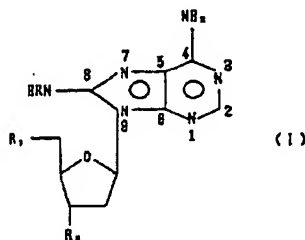
㉙ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

㉚ 指 定 国 J P, U S

最終頁に続く

請求の範囲

1. 式(1)



(式中、R₁は-OH、-OP(O)₂H、-OP(O)₂H₂、-OP(O)₂H₃基、又はオリゴヌクレオチドから選択され、R₂は水素原子、-OH基、又はオリゴもしくはポリヌクレオチドから選択され、Rはアミノアルキル基を表す)に対応する2'-デオキシアデノシン誘導体から生成されることを特徴とする核酸検出用プローブ。

2. R₁が構造-(CH₂)_n-NHX(nは4~12の整数、Xは水素原子又は分子マーカーとして機能することが可能な基を表す)に対応することを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

3. マーカー基がローグミン、フルオレセインもしくはグ

ンシルのような着色もしくは蛍光基、ハプテン、ホスファターゼもしくはペルオキシダーゼのような酵素、ペプチド又はビオチンから選択されることを特徴とする請求項2に記載のプローブ。

4. アデノシン残基が酵素的手段によりヌクレオチド鎖に組み込まれていることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のプローブ。

明 細 書

2'-デオキシアデノシン誘導体を含む核酸検出用プローブ

本発明は2'-デオキシアデノシン誘導体を含む核酸検出用プローブに係る。

DNA又はRNA配列を検出及び単離するために、プローブとして使用されるヌクレオチドの決定配列と、核酸を含む組成物中に場合によって含まれるプローブのヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列とをハイブリダイズする方法を使用することは、当業者に周知である。

従来、相補的DNA(cDNA)又はメッセンジャーRNA(mRNA)のフラグメントを検出するには、これらのフラグメントを放射性同位体、主にリンの同位体(^{32}P)で標識したオリゴデオキシヌクレオチドとハイブリダイズする方法が利用されている。

一般にホットプローブと呼ばれる放射性同位体で標識したこのようなプローブは検出感度が高い。しかしながら、放射性マーカーの使用は種々の欠点により制限されている。

まず使用される放射性元素の寿命は一般に短いので、プローブを常に交換しなければならず、原価が高つく。

また、放射性物質を使用するには特殊な設備と公的な許可が必要であり、このような許可を得るのは容易でない。

(84-11095)
特許第40995号にもプリン塩基として修飾アデニン残基を含むオリゴヌクレオチドフラグメントから構成されるプローブが記載されている。

本発明者らは当該分野で研究を続けた結果、酵素的手段によりオリゴヌクレオチド配列に組み込まれ得る誘導体を生成することができた。

これらの2'-デオキシアデノシン誘導体は、改良された特性を有する生成物を使用しながら既に調製されている修飾塩基の利点を利用することができる。

また、該誘導体の取得方法についても記載する。

本発明は、オリゴヌクレオチド配列を酵素合成するためにこれらの誘導体を使用すること、及び特に、容易に使用できる非放射性方法により検出できる経時的に安定な高精度プローブを作成するためにこれらの配列を生物字に利用することを目的とする。

2'-デオキシアデノシン誘導体は8位にアミノアルキル鎖を有しており、下式(I)に対応する。

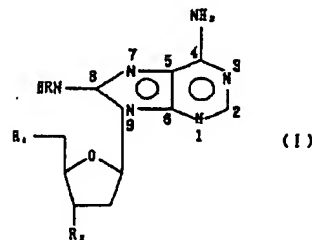
更に、このようなホットプローブを使用する定量的自動化を達成するのは困難であることが認められている。

最近になって、放射性元素を含まないプローブを酵素的手段により構成する方法が開発された。一般にコールドプローブと呼ばれるこのようなプローブは、酵素反応又は免疫酵素反応によりDNA又はRNAを検出することができる。

例えばNucleic Acids Res.1982,10,6787頁に所収のVINCENT C.他の論文は、抗原-モノクローナル抗体系(1,2)、又はペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ又はガラクトシダーゼ(3,4,5)のような酵素と結合したビオチン-アビジン系(3)に基づくコールドプローブについて記載している。

1985年以来、酵素的な組み込み及び検出を目的として修飾されたヌクレオチドが提案されている。これらのヌクレオチドとしては、5'位をビオチニル化されたホスホラミダイト誘導体(6,7)、フォトビオチンとの誘導体(8)、及び5'-アミノヌクレオチド(9,10)が挙げられ、これらのヌクレオチドはコールドプローブに組み込まれると共にDNAの配列決定に役立つ。

本出願人名義の1984年8月22日付け仏国特許出願第40995号



なお式中、 R_1 は $-\text{OH}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})\text{R}_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})\text{R}_3$ 、 $-\text{OP}(\text{O})\text{R}_4$ 基、又はオリゴヌクレオチドから選択され、 R_2 は水素原子、 $-\text{OH}$ 基、又はオリゴもしくはポリヌクレオチドから選択され、 R_3 はアミノアルキル鎖を表す。

この鎖 R はより特定のには構造 $-(\text{CH}_2)_n$ 、 $-\text{NHX}$ に対応し、ここで n は4~12の整数、 X は水素原子、又は分子のマーカーとして機能し得る基を表す。

適当なマーカー基はローダミン、フルオレセイン又はゲンシルのような着色又は蛍光基である。

他の X 基はハプテンから成る。

更に他の X 基はホスファターゼ又はペルオキシダーゼのような酵素により形成される。

ヘアチドもマーカースとして使用できる。

より有利にはXはビオチンを表す。

上記誘導体は高い安定性及び感度を有するプローブを生成することができる。該誘導体は免疫酵素法により検出できるという利点もある。

別の非常に有利な態様によると、これらのヌクレオチドを酵素(例えばポリメラーゼ、ターミナルヌクレオチジルトランスフェラーゼ、リガーゼ)によりDNA又はRNAフラグメント中に組み込むことができる。

アミノアルキル置換鎖のX基が水素原子を表す誘導体は、ヌクレオチド配列への組み込み以前でも以後でもマーカースに結合できるという利点がある。

X基がマーカースである誘導体は、オリゴヌクレオチドの相補体を含むオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション実験において、放射活性標識せずに配列を検出することが可能である。

有利にはXは着色又は蛍光基、特にローグミン、フルオレセイン、ゲンシールから選択される。

変形例としてXはハプテン、例えばジニトロフェニルである。

鎖、あるいは遊離アミノ基のブロッキング後にシアノエチルリン酸のような試薬でリン酸化することにより得られる。

適当なブロッキングはベンジルオキシカルボニル基で実施される。

対応するジ及びトリリン酸誘導体は5'-モルホリデート誘導体とリン酸塩又はピロリン酸塩との作用により得られる。

上記ヌクレオチドは酵素的にオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

有利にはこの組み込みは「ニックトランスレーション」なる方法により実施される。

この手順によると、DNA又はRNAフラグメント中の規則的な間隔で並んだ部位にヌクレオチドを均一に組み込むことができる。そのためには、3'末端に遊離の-OHを生じる酵素、特に大腸菌のDNAアーゼIでDNA又はRNAフラグメントを処理する。次いで、DNAポリメラーゼIと反応させることによってDNA又はRNAフラグメント中に所望のヌクレオチドを組み込むことができる。

変形例として、ヌクレオチドの酵素組み込みはターミナルデオキシトランスフェラーゼを一重又は二重鎖DNAフラ

他の有利な誘導体において、Xは酵素、特にペルオキシダーゼ、ホスファターゼを表す。

別の具体例においてXはビオチンを表す。

上記アデノシン誘導体はR₁及び糖残基の3'位の-OH基を介して酵素的にヌクレオチド鎖に組み込まれ得る。

形成されるオリゴ又はポリヌクレオチドも本発明の範囲に含まれる。

上記アデノシン誘導体は有利に、プリン塩基の8位が活性化された2'-デオキシアデノシン誘導体を式(II):



(式中、n及びXは上記と同義である)のジアミンと反応させる方法を使用する合成経路により得られる。

8位が活性化されたアデノシン誘導体としては、ハロゲン化物を使用すると有利である。より特定のには臭化物又は塩化物を使用する。

式(II)のジアミンとの反応は有機溶媒の存在下で実施される。適当な溶媒はメタノール、エタノール、プロパノール、ピリジンである。

糖残基の5'位がリン酸基を含むアデノシン誘導体は好ましくは、Xが水素原子を表す場合にはヌクレオチド上で置

置メントと共に使用することにより実施され得る。

Rが-(CH₂)_n-NH₂基を表し、nが上記と同義である上記の好適な誘導体を使用する別の具体例によると、アデノシン誘導体をヌクレオチド配列に酵素的に組み込み、次にビオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルをヌクレオチド配列に作用させることによりビオチンを化学的に導入する。

同様の反応により種々のX基を導入することができる。

上記アデノシン誘導体は、例えば生物液体混合物又は細胞溶解物中に存在している核酸配列を検出及び単離するためのプローブとして使用可能なヌクレオチド配列を作成するために非常に有利な合成中間体を構成する。

これらのヌクレオチド配列はアデニン基にもたらされた修飾により、高感度で相補的配列とハイブリダイズして高安定性のハイブリッドを形成することが可能である。

本発明の誘導体を含むヌクレオチド配列から得られるプローブは、更に経時的に高い安定性を有しており、数年間保存できる。

プローブ中に含まれるヌクレオチド配列とハイブリダイズする相補的ヌクレオチド配列の検出は、X基に基づく放射活性方法により実施され得る。

非放射活性法とは、例えば着色(発色)又は蛍光(発光)生成物を使用する光化学的検出反応を意味する。

変形例として、検出は酵素又は抗体を使用する免疫酵素反応により実施され得る。

ヌクレオチドがビオチン分子の導入により修飾されているような本発明の好適具体例によると、ビオチンと酵素を結合させる。

有利には、ビオチンと共に安定複合体を形成するアビジンを使用する。この結合はハイブリダイゼーション反応後に実施され得る。

変形例によると、アビジンそれ自体は検出用生成物、例えばローグミン又はフルオレセインのような着色又は蛍光性化合物と結合される。

他の変形例によると、アビジンは反応後に容易に検出できる不溶性生成物を形成する酵素と結合される。

有利には、この第2の酵素はアルカリホスファターゼ又はペルオキシダーゼである。

ビオチンの検出は抗ビオチン抗体を使用しても実施できる。

当然のことながらこの化学的修飾は、後でプローブが所

望のDNA配列又はフラグメントとハイブリダイズする際の妨げとならないように実施しなければならない。

本発明のプローブは、有利には感染性の細菌及びウイルスで相補的DNA配列を検出するために使用される。このような細菌及びウイルスとしてはCblasydia、Campylobacter、Brucella、Parvovirus、ビートの根菌病(rhizomania)に感染するウイルス、B型肝炎ウイルスが挙げられる。

これらのプローブは細菌の抗生物質耐性を検出するためにも使用できる。

本発明の他の特徴及び利点は2'-デオキシアデノシン誘導体の合成及びプローブ作成のためのその使用に関する以下の実施例から明らかになろう。

8位をビオチニル鎖で置換されたプリン誘導体の合成例

8-N-[1-アミノ-10-デカニル]-2'-デオキシアデノシン(化合物1)

15.17g、47mmoleの8-ブロモ-2'-デオキシアデノシン(3)と32g、186mmoleの1,10-ジアミノデカンとを350mlのエタノールに混合し、24時間還流した。次に溶液を濃縮乾燥し、得られた残渣をエチルエーテルで数回洗い、過剰のジアミンを抽出した。溶媒としてイソプロパノール-NH₄OH-H₂O(8

-1-1)の3元混合物を使用して低圧下で残渣のフラクションをシリカカラムで精製した。

F(沸点):190℃

C₂₈H₄₈N₆O₅(421)の

理論値 C58.98; H8.37; N23.25

実測値 C58.82; H8.59; N23.65.

8-N-[1-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-10-デカニル]-2'-デオキシアデノシン(化合物2)

3.7g(8.5mmole)の化合物1を30mlの水と40mlのエタノールの混合物に加熱下に溶解させた。溶液の温度を室温にし、4.5g、17.7mmoleのN-ベンジルオキシカルボニル-N'-メチルイミダゾリウムクロリドを加え、24時間磁気攪拌下においた。溶液を濃縮乾燥し、得られたシロップをシリカクロマトグラフィ(CH₂Cl₂-H₂O)(H₂O=メタノール)により精製した。

72%の収率に対応する3.33gのベンジルオキシカルボニル化合物が得られた。

8-N-ベンゾイル-8-N-[1-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-10-デカニル]-2'-デオキシアデノシン(化合物3)

2.38g(4.28mmole)の化合物2をピリジン(Merck)で2回共

蒸発させることにより乾燥した後、同一の無水溶媒15mlに溶解させた。0℃(浴:氷水)で3.7mlの塩化ベンゾイルを滴下添加し、混合物を室温にした。24時間後、5mlのメタノールを加えることにより過剰の反応物を除去し、溶液を乾燥濃縮した。残渣を100mlのCH₂Cl₂に溶解させ、まずNaHCO₃の飽和溶液、次に水で洗った。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、真空蒸発させた。

12.8mlのピリジンと8.4mlのエタノールの混合物(氷水浴中で冷却)にシロップを溶解させ、ここに8Nのソーダ3.5mlを加えた。30分後、溶液をH⁺形のDowex 50 WX8樹脂で中和した。樹脂をろ過してメタノールで濯ぎ、溶媒を乾燥するまで濃縮した。モノベンゾイル化誘導体がエタノール中に結晶した。

F: 87-88℃(エタノール)

NMR ¹H 400MHz: (CDCl₃+TMS): δ=1.20(m, 16H, CH₂ (2,8)); 1.38(m, 2H, CH₂ (9)); 1.55(m, 2H, CH₂ (2)); 2.22(m, 1H, H²); 2.67(m, 1H, H²); 3.10(m, 2H, CH₂ (10)); 3.35(m, 2H, CH₂ (1)); 3.87(m, 2H, H^{5'}); 4.08(m, 1H, H⁴); 4.89(m, 1H, H⁸); 4.78(s, 1H, NH); 5.08(s, 3H, CH₃δ+NH); 6.50(q, 1H, H¹); 7.37(s, 5H,

δ); 7.41-7.49(m, 3H, H^δ'p, H^δ'm'); 7.98-8.00(s + s, 2H, H^δ'oo'); 8.4(s, 1H, H²).

8-N-ベンゾイル-3'-ベンゾイル-8-N-[1-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-10-デカニル]-2'-デオキシアデノシン(化合物4)

2g(3mmole)の化合物3を6.5mlのピリジンに溶解させ、1.19g(3.9mmole)の塩化ジメトキシトリチルを加えた。室温で2時間半後、メタノールを数滴加えることにより過剰の反応物を除去し、乾燥濃縮し、残渣をCH₂Cl₂に溶解させ、まず炭酸水素ナトリウムの飽和溶液、次に水で洗った、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過及び真空蒸発後、沈澱物を石油エーテルで洗った。

トリチル化誘導体(1.85g, 1.9mmole)を25mlのピリジン(Merck)に溶解させ、2.8g(11.4mmole)の塩化ベンゾイル及び115mgのDMAPを加えた。室温で1時間半後、真空濃縮し、CH₂Cl₂で希釈し、まず炭酸水素ナトリウムの飽和溶液、次に水で洗い、石油エーテルで沈澱させた。

2%のBSAを含有するCH₂Cl₂-MeOH(7-3)混合物30mlに沈澱物を溶解させ、室温で10分後、溶液を洗い(NaHCO₃及びH₂O)、乾燥し、真空濃縮した。残渣をシリカクロマトグラフィ(溶

え、1時間攪拌し、ピリジンを加熱乾燥し、10mlの水に残渣をとった。形成されたジシクロヘキシルウレアをろ過し、10mlの水で濯いだ。母液を濃縮し、残渣を30mlの6N NH₄OHにとり、60℃で24時間インキュベートした。アンモニア溶液を濃縮し、得られたシロップを、溶媒としてエタノール-水混合物(EtOH-H₂O)(1-2)を使用してセファデックスC10で精製した。紫外線及びリン定量に陽性のフラクションを凍結乾燥後、178mg(収率49%)のモノリン酸塩を得た。

200mgのモノリン酸塩を水-メタノール混合物(1-1)に溶解させた後、モルホリニウム形態のDowex 50 WX8樹脂のカラム(3×1cm)に溶液を通した。溶出液が紫外線を吸収しなくなるまでカラムをこの混合物で洗った。

溶液を濃縮し、残渣を3mlのi-ブチルアルコール及び3mlのH₂Oにとり、105mlの蒸留モルホリン(4当量)を加え、4.5mlのi-ブチルアルコールに溶解した259mg(1.25mmole)のDCCを滴下添加した。4時間還流した。溶媒としてイソプロパノール-NH₄OH-H₂O混合物(7-1-2)を使用してシリカ薄層クロマトグラフィで分析した。反応は終了していた。

母液を室温まで冷却し、形成された沈澱物をろ過し、i-ブチルアルコールで洗った。母液を真空乾燥した。残渣を

CH₂Cl₂-MeOHにより精製した。

NMR ¹H 400MHz: (CDCl₃+TMS): δ=1.25(s, 18H, CH₃ (3-8)); 1.46(s, 2H, CH₂ (9)); 1.83(s, 2H, CH₂ (2)); 2.47(dd, 1H, H²); 2.97(s, 1H, H²); 3.17(s, 2H, CH₂ (10)), 3.47(s, 2H, CH₂ (1)); 4.03(d, 1H, H⁵); 4.16(d, 1H, H⁵); 4.31(s, 1H, H⁴); 5.08(s, 2H, CH₂ φ); 5.71(d, 1H, H³); 6.86(s, 1H, H¹); 7.33(s, 5H, φ); 7.45-7.65(s, 2H, H^δ'm'); 7.82(d, 1H, H^δ'p); 8.00-8.12(2d, 2H, H^δ'oo'); 8.57(s, 1H, H₈); 9.10(s, 1H, NHCO φ').

8-N-[1-アミノ-10-デカニル]-2'-デオキシアデノシン5'-トリリン酸(化合物5)

327mg(0.428mmole)の化合物4、1mmoleのピリジニウムのシアノエチルリン酸塩(1mmole/mlの貯蔵溶液1ml)を5mlのピリジンに溶解して成る溶液を30℃で真空濃縮した。得られたシロップを10mlのピリジンに2回溶解させた後、真空乾燥した。無水ピリジンで同一の操作を繰り返した。

乾燥残渣を5mlの無水ピリジンに溶解させ、約0.5g(6当量)のN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を加え、混合物を室温で48時間磁気攪拌下においた。3mlの水を加

水に溶解させ、水相をエーテル(15ml)で3回抽出した。水相を濃縮して収率75%でモルホリデートを得た。

5mlの水に溶解した178mg(1mmole)のピロリン酸に、10mlのピリジン(Merck)及び1.05ml(4.2mmole)の蒸留トリ-n-ブチルアミンを加えた。シロップが得られるまでこの均質溶液を蒸発させ、10mlの無水ピリジンで4回連続的に共蒸発することにより脱水した。

次に、別に蒸留したトルエン(5ml)で2回共蒸発させることにより残留ピリジンを除去し、4人のモレキュラーシーブで回収した。

次にジメチルスルホキシド(DMSO)(5ml、無水)に溶解したモルホリデートにトリ-n-ブチルアミンのピロリン酸塩を加えた。

溶液を室温に維持し、24時間後に上記のように調製したトリ-n-ブチルアミンのピロリン酸塩0.5mmoleを加えた。室温で3時間後、モルホリデートが消失したので5mlの水を加え、炭酸水素塩形態のDEAEセルロースカラム(2.5×30cm)に溶液を通した。溶出液が紫外線を吸収しなくなるまでカラムを水洗した。後、重炭酸トリエチルアンモニウムの0.35Mの直線勾配で溶離した。

(紫外線-リン)で同定されたトリリン酸塩を含むフラクション(3ml)を合わせて蒸発乾燥(約30-35℃)した。メタノールと共に数回蒸発させ、水に数回溶解させてから凍結乾燥し、TEABを除去した。

200mgのモノリン酸塩から36mgのトリリン酸塩が得られ、収率は23%であった。

質量分析

$C_{10}H_{18}N_4O_{12}P_3$ の理論値 $M = 861.16$

実測値 $[M+H]^+ = 862.16$

NMR 1H 400MHz: (D₂O): $\delta = 1.8(m, 14H, \text{デシルプロトン})$; 1.49(t, 2H, デシルプロトン); 1.01(s, 2H, デシルプロトン); 2.18(dd, 2H, H'2); 2.68(m, 1H, H'2); 2.84(t, 2H, デシルプロトン); 3.38(s, 2H, H5'5"); 4.14(dd, 1H, H'4); 4.30(t, 1H, H'3); 4.85(BDQ); 6.35(q, 1H, H'1); 7.98(s, 1H, H2)。

NMR ^{31}P 162MHz: (D₂O): $PO_4 = -8.209(d, 1P, P_{\alpha}, J_{\alpha\beta}P_{\alpha}, J_{\alpha\gamma}P_{\alpha} = 19.45Hz)$; $-0.868(d, 1P, P_{\beta}, J_{\beta\alpha}P_{\beta}, J_{\beta\gamma}P_{\beta} = 19.45Hz, J_{\beta\alpha\gamma}P_{\beta} = 0Hz)$; $-20.987(t, 1P, P_{\gamma}, J_{\gamma\alpha}P_{\gamma} = J_{\gamma\beta}P_{\gamma} + 19.45Hz)$ 。

8-N-[1-N-ビオチニル-10-デカニル]-2'-デオキシアデノシ

ン5'-トリリン酸(化合物9)

別に蒸留したジメチルホルムアミド(DMF)(100μl)に1Nの炭酸水素ナトリウム(200μl)及びビオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル(5mg)を溶解してなる溶液をトリリン酸塩(9mg)に加えた。

4℃で24時間後(ニンヒドリン試験:陽性)、反応媒体に水(1ml)を加えた後、セファデックスC10のクロマトグラフィカラムにおいた。水で溶離すると紫外線を吸収する主なピークが2つ現れ、その一方のみが糖試験で陽性、アミン試験で陰性応答を示した。この溶離液のフラクション(3ml)を合わせて蒸発乾燥後、高性能液相クロマトグラフィー(HPLC){マクレオジルMac160silカラム5C18 4.6×250mm}で精製し、凍結乾燥した。収率は18%であった。

質量分析

$C_{20}H_{38}N_{10}O_{11}SP_3$ の理論値 $M = 887$

実測値 $[M+H]^+ = 888.63$

次に、本発明の好適な誘導体で実施されるDNA配列の検出例を説明する。

B型肝炎ウイルスのゲノムの一部を含むDNAのヌクレオチド配列の検出

1. 材料及び方法

化合物9を「ニックトランスレーション」法によりB型肝炎ウイルスのゲノムの一部分を2回含むプラスミドpCP10(12)に酵素的に組み込んだ。

酵素による組み込みは、置換率に間接的に従い得るようにトリチウム置換したdCTPの存在下で実施した。

化合物9は大腸菌のDNAポリメラーゼIに対して使用可能な基質である。

0.2mMの化合物9の存在下で14%のアデノシンを300μgのプラスミドpCP10に置換した。

このビオチニル化アプローブの検出限界の決定は、以下の方法を使用して計算した。

種々の濃度のビオチニル化アプローブ1μlをニトロセルロース膜上においた。次にこの膜を2時間真空で80℃に加熱し、ウシアルブミン(1%)の塩化ナトリウム(0.15M)及びTween(0.1%)を含む緩衝液tris-HCl 10mM, pH8の存在下で飽和させ、非特異的吸着を減少させた。膜に固定化したアプローブを検出するには、アビジン、ストレプトアビジン又はアルカリホスフェートで標識した抗ビオチン抗体と共に1時間インキュベートした後、適当な基質中で30分間イン

キュベートした。検出系の種類(アビジン、ストレプトアビジン又は抗体)及び使用される条件に関係なく1.5pgまでのアプローブを検出することが可能であった。

相同DNA配列を含む標的DNAを検出するためにこのビオチニル化アプローブを使用した時、検出限界は8pgであった(75μg/mlに濃縮したアプローブを使用して68℃で18時間行う従来の一重鎖ハイブリダイゼーションプロトコール(13)による)。

ビオチニル化アプローブは50%のホルムアミドと共に42℃で使用することもできる。該アプローブはこの条件で完全に安定であった。

既述したように、本発明は上記実施例限定されずあらゆる変形を包含するものである。

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/TR 87/00291 (SA 18069)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 39/10/87

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8402285	10/08/84	AU-A- 2813984 EP-A- 0135387	10/09/84 03/04/85
WO-A- 8302277	07/07/83	FR-A, B 2319005 EP-A, B 0087657 CA-A- 1201474	01/07/83 11/01/84 11/02/86
WO-A- 8302275	07/07/83	FR-A, B 2319004 EP-A- 0097866	01/07/83 11/01/84
FR-A- 2569407	28/02/86	EP-A- 0176396 JP-A- 61069788	02/04/86 10/04/86

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (a) Give the Classification Symbol, indicate all 3 According to International Patent Classification (IPC) or to Paris Convention (Supplementary Class I)		International Application No. PCT/FR 87/00291	
Int. Cl. 4 C 07 H 21/04; C 07 H 19/173; C 07 H 19/20; C 12 Q 1/68			
2. FILMS SEARCHED		Minimum Documentation Searched?	
Classification Symbol		Classification Symbol	
Int. Cl. 4 C 07 H 21/00 C 07 H 19/00			
Documentation Searched other than Minimum Documentation at the Exact Date such Documentation are Included in the Patent Searched 1			
3. DOCUMENTS COMBINED TO BE HELPFUL*			
(Country) 1	Citation of Document, 21 with indication, where appropriate, of the relevant passages 22	Reference to Claim No. 23	
X	WO, A, 84/03285 (MOLECULAR BIOSYSTEMS, INC.) 30 August 1984 see pages 25-29, 65; claims	1-3	
A	WO, A, 83/02277 (INSTITUT PASTEUR) 7 July 1983 see pages 10-13	1-3	
A	WO, A, 83/02276 (INSTITUT PASTEUR) 7 July 1983 see pages 10,11	1-3	
A	FR, A, 2569407 (INSTITUT PASTEUR ET CNRS) 28 February 1986 see claims (cited in the application)	1-3	

* Number comprises at least documents 11 11a) documents defining the general state of the art which is not pertaining to the art of particular relevance 11b) other documents not constituting an art or other the constituted being data 11c) documents which may have brought an specific advance or document in state in relation to the specific state of another related art, or which may have brought an specific advance or document relating to an art and document, use, utilization or other matter 11d) documents published prior to the international filing date or the date the invention date claimed			
** Two documents mentioned under the international filing date 12a) priority claim and not in conflict of state, advantage and 12b) other documents not constituting an art or other the constituted being data			
*** Statement of particular relevance: the stated document contains an international claim in conflict with the international claim in conflict with			
**** Statement of particular relevance: the stated document contains an international claim in conflict with the international claim in conflict with			
***** Statement of particular relevance: the stated document contains an international claim in conflict with the international claim in conflict with			
14) Number of the same nature known to a person skilled in the art			
IV. CERTIFICATIONS			
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of the International Search Report	
21 October 1987 (21.10.87)		20 November 1987 (20.11.87)	
International Searching Agency		Signature of Authorised Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE			

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

第1頁の続き

④Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

C 12 Q 1/68
G 01 N 33/58

A-6807-4B
A-8305-2G

⑤発 明 者

ゲドン, ジャン・リュック

フランス国、75015・パリ、リュ・デュ・アモー・12